

- (4) Bonde, M; Clin Chem 1994, V40, P2022 HCAPLUS
- (5) Bonde, M; Clin Chem 1996, V42, P1639 HCAPLUS
- (6) Bonde, M; J Clin Endocrinol Metab 1995, V80, P864 HCAPLUS
- (7) Brennan, T; Protein Sci 1993, V2, P331 HCAPLUS
- (8) Clarke, S; Int J Pept Protein Res 1987, V30, P808 HCAPLUS
- (9) Colwell, A; Osteoporosis 1990 1990, P590
- (10) Delmas, P; J Bone Miner Res 1993, V8(Suppl 2), P549
- (11) Eyre, D; Anal Biochem 1984, V137, P380 HCAPLUS
- (12) Eyre, D; J Biochem 1988, V252, P495 HCAPLUS
- (13) Eyre, D; Methods Enzymol 1987, V144, P115 HCAPLUS
- (14) Fledelius, C; Calcif Tissue Int 1994, V54, P381 MEDLINE
- (15) Fledelius, C; Scand J Clin Lab Invest 1997, V57, P73 MEDLINE
- (16) Galletti, P; Biochem J 1995, V306, P313 HCAPLUS
- (17) Garner, P; J Bone Miner Res 1995, V79, P780
- (18) Geiger, T; J Biol Chem 1987, V262, P785 HCAPLUS
- (19) Haley, E; Biochemistry 1966, V5, P3229 HCAPLUS
- (20) Hayakawa, Y; J Biochem 1994, V115, P15 HCAPLUS
- (21) Henkel, W; Eur J Biochem 1987, V165, P427 HCAPLUS
- (22) Johnson, B; J Biol Chem 1989, V264, P14262 HCAPLUS
- (23) Kadler, K; Protein Profiles: Extracellular Matrix 1: Fibril-forming Collagens 1994, P512
- (24) Kim, S; J Biol Chem 1980, V255, P338 HCAPLUS
- (25) Kivirikko, K; Int Rev Connect Tissue Res 1970, V5, P93 HCAPLUS
- (26) Kuhn, K; Immunochimistry of the Extracellular Matrix 1982, P1
- (27) Kuypers, R; Biochem J 1992, V283, P129 HCAPLUS
- (28) Lowenson, J; Blood Cells 1988, V14, P103 HCAPLUS
- (29) Manolagas, S; N Engl J Med 1995, V332, P305 MEDLINE
- (30) McFadden, P; Proc Natl Acad Sci U S A 1987, V84, P2595 HCAPLUS
- (31) Oliyai, C; Pharm Res (N Y) 1994, V11, P751 HCAPLUS
- (32) Potter, S; Protein Sci 1993, V2, P1648 HCAPLUS
- (33) Reid, K; Biochem J 1976, V155, P10
- (34) Robins, S; Biochem J 1983, V215, P167 HCAPLUS
- (35) Robins, S; Osteoporosis 1990 1990, P465
- (36) Scott, J; Biosci Rep 1981, V1, P611 HCAPLUS
- (37) Scott, J; J Biochem 1983, V93, P921 HCAPLUS
- (38) Siris, E; Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of the Mineral Metabolism 1993, P375
- (39) Termine, J; Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism 1993, P21
- (40) Tyler-Cross, R; J Biol Chem 1991, V266, P22549 HCAPLUS
- (41) Weiss, P; J Clin Invest 1969, V48, P1 HCAPLUS

L81 ANSWER 10 OF 29 HCAPLUS COPYRIGHT 2006 ACS on STN
 AN 1997:203828 HCAPLUS
 DN 126:183499
 ED Entered STN: 28 Mar 1997
 TI Determination of **type II-collagen**
 telopeptide for bone disease diagnosis
 IN Nakamoto, Tadakatsu; Pponda, Hitomi; Kobayashi, Shinji; Hosoda, Kenji
 PA Teijin Ltd, Japan
 SO Jpn. Kokai Tokkyo Koho, 7 pp.
 CODEN: JKXXAF
 DT Patent
 LA Japanese
 IC ICM G01N0033-53
 ICS C07K0016-18; C12N0015-02; C12P0021-08; G01N0033-531; G01N0033-535;
 G01N0033-577; C12R0001-91
 CC 9-2 (Biochemical Methods)
 Section cross-reference(s): 14
 FAN.CNT 1

	PATENT NO.	KIND	DATE	APPLICATION NO.	DATE
PI	JP 09021803	A2	19970121	JP 1995-172196	19950707 <--
PRAI	JP 1995-172196		19950707 <--		

CLASS

PATENT NO.	CLASS	PATENT FAMILY CLASSIFICATION CODES
JP 09021803	ICM	G01N0033-53
	ICS	C07K0016-18; C12N0015-02; C12P0021-08; G01N0033-531; G01N0033-535; G01N0033-577; C12R0001-91
	IPCI	G01N0033-53 [ICM,6]; C07K0016-18 [ICS,6]; C12N0015-02 [ICS,6]; C12P0021-08 [ICS,6]; G01N0033-531 [ICS,6]; G01N0033-535 [ICS,6]; G01N0033-577 [ICS,6]; C12R0001-91 [ICS,6]

AB A simple and accurate method for detecting the **type II** **-collagen** telopeptide in mammalian body fluids is described using monoclonal antibodies in the so-called **sandwich** method for the diagnosis of metabolism disorders of the cartilage. A kit for the determination method is presented.

ST **collagen** telopeptide detn body fluid diagnosis

IT Bone, disease
(determination of **type II-collagen** telopeptides for bone disease diagnosis)

IT Antibodies
RL: ARG (Analytical reagent use); ANST (Analytical study); USES (Uses)
(monoclonal; in determination of **type II-collagen** telopeptides for bone disease diagnosis)

IT Peptides, analysis
RL: ANT (Analyte); ANST (Analytical study)
(telo-; determination of **type II-collagen** telopeptides for bone disease diagnosis)

IT **Collagens, analysis**
RL: ANT (Analyte); ANST (Analytical study)
(**type II**; determination of **type II-collagen** telopeptide for bone disease diagnosis)

L81 ANSWER 11 OF 29 HCAPLUS COPYRIGHT 2006 ACS on STN

AN 1997:81688 HCAPLUS

DN 126:168697

ED Entered STN: 05 Feb 1997

TI Isomerized molecules in serum derived from bone resorption

AU Cloos, P. A. C.; Bonde, M.; Fledelius, C.; Christgau, S.; Christiansen, C.

CS Osteometer BioTech A/S, Herlev, DK-2730, Den.

SO International Congress Series (1996), 1118(Osteoporosis 1996), 227-231

CODEN: EXMDA4; ISSN: 0531-5131

PB Elsevier

DT Journal

LA English

CC 9-10 (Biochemical Methods)

Section cross-reference(s): 1, 13, 14

AB We developed 2 serum-based **ELISAs**, CrossLaps serum **ELISA** (β -CLS) and α -CrossLaps serum **ELISA** (α -CLS), measuring the isopeptide and normal peptide form, resp., of the **collagen** type I specific sequence EKAHDGGR. In the isomerized form, the aspartyl residue (D) is linked to the glycine residue (G) via the β -carboxyl group of the side chain rather than through the α -carboxyl group. The aim of the present study was to investigate

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-21803

(43) 公開日 平成9年(1997)1月21日

(51) Int.Cl. ⁴	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/53			G 0 1 N 33/53	D
C 0 7 K 16/18		8517-4H	C 0 7 K 16/18	
C 1 2 N 15/02			C 1 2 P 21/08	
C 1 2 P 21/08			G 0 1 N 33/531	A
G 0 1 N 33/531			33/535	

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 7 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平7-172196	(71) 出願人	000003001 帝人株式会社 大阪府大阪市中央区南本町1丁目6番7号
(22) 出願日	平成7年(1995)7月7日	(72) 発明者	中本 忠克 山口県岩国市日の出町2番1号 帝人株式会社岩国研究センター内
		(72) 発明者	本田 仁美 山口県岩国市日の出町2番1号 帝人株式会社岩国研究センター内
		(72) 発明者	小林 慎治 東京都日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人株式会社東京研究センター内
		(74) 代理人	弁理士 前田 純博

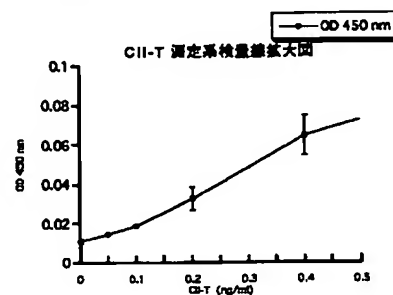
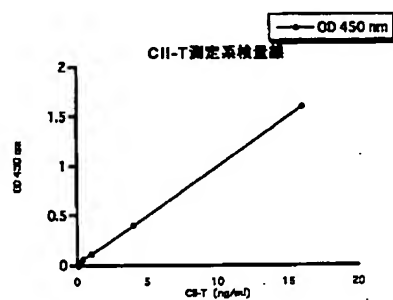
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 2型コラーゲンテロペプチドの測定方法

(57) 【要約】

【目的】 哺乳動物の体液中に存在する2型コラーゲンテロペプチドを簡便かつ精度よく測定する方法を提供すること、およびそれに用いるモノクローナル抗体を得ること。軟骨の代謝異常が原因となる疾患の診断、治療、経時の追跡に用いられる。

【構成】 哺乳動物の体液中の存在する2型コラーゲンテロペプチドの量の測定において、抗2型コラーゲンテロペプチド抗体を用いる方法。特に不溶性担体に固定されたものと、標識物質で標識されたものを用いたサンドイッチ法による測定方法。また、それに用いる哺乳動物の2型コラーゲンテロペプチドを認識するモノクローナル抗体、ならびにそれを使用した2型コラーゲンテロペプチド測定キット。



1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 哺乳動物の体液中に存在する2型コラーゲンテロペプチド量の測定において、抗2型コラーゲンテロペプチド抗体を用いることを特徴とする2型コラーゲンテロペプチドの測定方法。

【請求項2】 不溶性担体に固定された抗2型コラーゲンテロペプチド抗体と、標識物質で標識された抗2型コラーゲンテロペプチド抗体とを用いるサンドイッチ法である請求項1記載の2型コラーゲンテロペプチドの測定方法。

【請求項3】 標識物質が酵素である請求項2記載の2型コラーゲンテロペプチドの測定方法。

【請求項4】 不溶性担体に固定された抗2型コラーゲンテロペプチド抗体と、標識物質で標識された抗2型コラーゲンテロペプチド抗体のうち、少なくとも一方が2型コラーゲンテロペプチドを認識するモノクローナル抗体である請求項2または請求項3記載の2型コラーゲンテロペプチドの測定方法。

【請求項5】 不溶性担体に固定された抗2型コラーゲンテロペプチド抗体と、標識物質で標識された抗2型コラーゲンテロペプチド抗体を含む試薬と、を含んでなる哺乳動物の体液中に存在する2型コラーゲンテロペプチドの測定キット。

【請求項6】 哺乳動物の2型コラーゲンテロペプチドを認識するモノクローナル抗体。

【請求項7】 (N末端)GPGIDMSAFAGLGPREKGPDP LQMRA (C末端)からなるアミノ酸配列部分と結合性を有する請求項6記載のモノクローナル抗体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、哺乳動物の2型コラーゲンテロペプチドを特異的に認識する抗体および該抗体を用いる哺乳動物の体液中に存在する2型コラーゲンテロペプチドの測定方法に関する。

【0002】

【従来の技術】2型コラーゲンテロペプチドは、1989年にクリントン・T・バードウインによってヒトの2型コラーゲンテロペプチドについての正確なcDNA配列が決定された蛋白質であって、分子量は2880の分子であることが知られている (Clinton T. Birdwin et al., Biochem. J. 262 521-528 (1989))。また、数々の文献でその存在が取り上げられ、コラーゲン蛋白の抗原性を示す部分であることが明らかになっている (藤本大三郎編「細胞外マトリックスのバイオサイエンスとバイオテクノロジー」ICP社刊 (1990))。その生理作用については、まだ不明なところが多いが、軟骨の代謝に深く関与することが推定されている。しかし、2型コラーゲンテロペプチドの病理学的研究の報告はほとんどない。

2

【0003】このように、軟骨の代謝に深く関与することが推定されながら、いまだ未開発の部分が多く、2型コラーゲンテロペプチドの研究は今後の展開が期待される分野の一つである。したがって、その2型コラーゲンテロペプチドを特異的にかつ簡便に感度よく測定する方法が望まれており、かかる方法は基礎医学、臨床医学の領域において非常に重要な意味をもつと考えられる。

【0004】しかし、2型コラーゲンテロペプチドの測定法の研究の報告としては、リーナ・アラ・コッコが、マウスの細胞での2型プロコラーゲンの発現を調べるために、当時、判明していたヒト2型コラーゲンテロペプチドの残基に対するポリクローナル抗体を用いた報告 (Leena Ala-Kokko et al., J. Biological Chemistry, 266 (22), 14175-14178 (1991)) があるのみである。この報告では、測定はウエスタン ブロットを用いて定性的に行われているにすぎない。また、動物の体液を測定するには至っておらず、動物の体液を直接測定できる測定方法は存在しなかった。つまり、本発明で成し遂げた動物の体液についての測定が、23残基のペプチドに対する抗体では不可能であった。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明が解決しようとする課題は、哺乳動物の体液中に存在する2型コラーゲンテロペプチドを簡便かつ精度よく測定する方法を提供すること、およびそれに用いる哺乳動物の2型コラーゲンテロペプチドを認識するモノクローナル抗体を得ることである。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、かかる従来技術の課題を鑑みて鋭意研究した結果、本発明に至った。すなわち、本発明は哺乳動物の体液中に存在する2型コラーゲンテロペプチド量の測定において、抗2型コラーゲンテロペプチド抗体を用いることを特徴とする2型コラーゲンテロペプチドの測定方法である。この方法においては、例えば不溶性担体に固定された抗2型コラーゲンテロペプチド抗体と、標識物質で標識された抗2型コラーゲンテロペプチド抗体とを用いるサンドイッチ法を採用することができる。また、かかる標識物質としては、酵素を用いることが好ましい。

【0007】さらに、不溶性担体に固定された抗2型コラーゲンテロペプチド抗体と、標識物質で標識された抗2型コラーゲンテロペプチド抗体のうち、少なくとも一方については、2型コラーゲンテロペプチドを認識するモノクローナル抗体を採用することが好ましい。

【0008】本発明はまた、上記の2型コラーゲンテロペプチドの測定方法において用いられる、哺乳動物の2型コラーゲンテロペプチドを認識するモノクローナル抗体である。かかるモノクローナル抗体は、不溶性担体に固定された抗2型コラーゲンテロペプチド抗体として

も、標識物質で標識された抗2型コラーゲントロペプチド抗体としても用いることができる。

【0009】このような哺乳動物の2型コラーゲントロペプチドを認識するモノクローナル抗体としては、例えば(N末端)GPGIDMSAFAGLGPREKGP DPLQMR(A末端)からなるアミノ酸配列部分と結合性を有するモノクローナル抗体が挙げられる。

【0010】さらに、本発明には不溶性担体に固定された抗2型コラーゲントロペプチド抗体と、標識物質で標識された抗2型コラーゲントロペプチド抗体を含む試薬と、を含んでなる哺乳動物の体液中に存在する2型コラーゲントロペプチドの測定キットが含まれる。かかるキットには、上記したもののほか、必要により該標識物質を検出するための試薬を含めることができる。

【0011】本発明で用いる抗体の作製にあたり、免疫原として用いる2型コラーゲントロペプチド(以下CII-Tと略す。)は、動物から分離精製された天然型のCII-T、合成ペプチドCII-T、あるいは遺伝子工学的手法によって作製された遺伝子組み換えCII-Tを用いることができる。このなかでも、CII-Tのように比較的短いペプチドの場合には、精製純度、再現性、収率の点から考えて合成ペプチドが好ましい。

【0012】これらのCII-Tは、公知の方法でキーホール・リンベット・ヘモシアニン(以下KLHと略す。)、ウシアルブミン等のキャリアー蛋白と複合体を作製して免疫原として用いられる。

【0013】本発明で用いる抗体は、ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよい。ポリクローナル抗体の場合には、アジュバンドとしてFreund's Complete Adjuvant、またはAl(OH)₃などを用い、CII-T-キャリアー蛋白複合体を公知の方法で動物に免疫することにより、その抗血清として得ることができる。

【0014】一方、モノクローナル抗体の場合には、ケラーとミルシュタインによる細胞融合法(G. Koeller and Milstein, Nature, 256, 495-497(1975))により作製されたハイブリドマを培養し、その培養液からCII-Tと反応する抗体を分離することにより調製される。細胞融合に用いられる細胞としては、P3U1などを挙げることができる。

【0015】こうした抗体を用いて、免疫学的測定法により体液中のCII-Tを修飾することなく、特異的かつ感度よく測定することができる。免疫学的測定法としては、酵素免疫測定法(EIA)、放射免疫定量法(RIA)、蛍光免疫測定法、免疫凝集法等を挙げることができる。EIAとしては、例えば「酵素免疫測定法」(第二版、石川栄治他著、医学書院1982)などに記載されている方法を用いることができる。EIAとしては、サンドイッチ法および競合法と称される方法を用いることができる。

【0016】サンドイッチ法によるEIAにおいては、CII-Tに対する抗体を2種類用い、例えば次のような手順に従い測定する。すなわち、2種類の抗体のうち一方の抗体(第一抗体)を適当な不溶性担体(例えばプラスチック容器)に固定化する(以下これを「固定化抗体」という)。次いで、不溶性担体と測定しようとする試薬または検体試料との非特異的結合を避けるために、適当な物質(例えばウシ血清アルブミン)で不溶性担体の表面を被覆する。このようにして得られた第一抗体が固定化された不溶性担体を、検体試料と一定時間および温度で接触させ反応させる。この間に固定化抗体(第一抗体)と検体試料中のCII-Tが結合する。次いで不溶性担体を適当な洗浄液で洗浄した後、適当な標識物質(例えば酵素)で標識したCII-Tに対する他方の抗体(第二抗体)の溶液(例えば水溶液)と一定時間および温度で接触させ、固定化抗体に結合したCII-Tと第二抗体を反応させる。これを適当な洗浄液で洗浄し、次いで不溶性担体上の固定化抗体とCII-Tを介して結合している第二抗体の標識物質の量を測定する。なお、上記サンドイッチ法は、固定化抗体、標識抗体、およびCII-Tを含有する検体試料を同時に混合し、一定時間および温度でこれら三者を同時に接触させて行うこともできる。

【0017】かくして、その値から検体試料中のCII-Tの量を算出することができる。通常サンドイッチ法では、第一抗体と第二抗体とが双方ともモノクローナル抗体であってもよいし、ポリクローナル抗体であってもよいし、一方をモノクローナル抗体とし、他方をポリクローナル抗体として用いることもできる。

【0018】競合法としては、例えば固相に固定した抗原と測定すべき抗原とに対し、一定量の標識抗体を競争的に反応させて固相抗原・標識抗体複合体を形成せしめ、洗浄操作の後、固相に結合した標識抗体の標識物質の量を測定する方法や、固相に抗体を固定し標識抗原と測定すべき抗原とを競争的に反応させて固相抗体・標識抗原複合体を形成せしめ、洗浄操作の後、固相に結合した標識抗原の標識物質の量を測定する方法を挙げることができる。

【0019】こうしたサンドイッチ法および競合法のそれぞれにおいては、抗体に代えてIgGをペプシンで消化して得られるF(ab')₂、F(ab')₂を還元して得られるFab'、または抗体をバビインで消化して得られるFabなどの抗体フラグメントを、あるいはこれらを標識して使用することができる。

【0020】本発明のCII-Tの測定方法において使用される不溶性担体としては、例えばポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエステル、ポリアクリロニトリル、フッ素樹脂、架橋デキストラン、アガロース、ポリサッカライドなどの高分子の他、紙、ガラス、金属、およびこれらの組み合わせなどを挙げることができる。不溶性

担体の形状は、例えばトレイ状、球状、繊維状、粒状、棒状、盤状、容器状、試験管等の種々の形状であってもよい。

【0021】また、標識抗体の標識物質としては、酵素、蛍光物質、蛍光物質または放射性物質等を使用することができる。酵素としては、ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ等を、蛍光物質としてはフルオレセインソチオシアネート、フィコビリプロテインなどを、そして放射性物質としては ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{14}C 、 ^3H などを使用することができるが、免疫学的測定法に使用し得るものであれば他のものでもよい。

【0022】標識物質が酵素の場合、酵素と抗CII-T抗体の結合方法は、グルタルアルデヒド法、過ヨウ素酸法、マレイミド法など通常の方法に従うことができる。例えばマレイミド化された抗体または抗体のフラグメントと、SH化された酵素を溶液中で反応することにより行うことができる。抗体または抗体のフラグメントのマレイミド化は、例えばサクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサノールボネート、スルホサクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサノールボネート、サクシンイミジールメタマレイミドベンゾエート(以下MBSと略す)、サクシンイミジール-6-マレイミドヘキサノエートなどによりマレイミド化することができる。酵素へのSH基の導入は公知の方法(「酵素免疫測定法」第二版、石川栄治他著、医学書院1982)に従うことができる。例えば酵素とS-アセチルメルカプト無水コハク酸、またはN-サクシンイミジール-3-(2-ピリジルチオ)プロピオネートなどと反応することにより行われる。

【0023】標識物質が酵素である場合には、その活性を測定するために基質および必要により発色剤が用いられる。これらの例としては、ペルオキシダーゼを用いる場合には基質として過酸化水素を用い、発色剤として2,2'-アジノジ(3-エチルベンズチアゾリンスルホン酸)アンモニウム塩、5-アミノサリチル酸、o-フェニレンジアミン、4-アミノアンチピリン、または3,3',5,5'-テトラメチルベンジジンなどを用いる。また、蛍光基質として3-(p-ヒドロキシフェニル)プロピオン酸などを用いることができる。酵素としてアルカリフォスファターゼを用いる場合には、基質としてo-ニトロフェニルホスフェート、3-(2'-スビロアダマンタン)-4-メトキシ-4-(3"-ホスホリルオキシ)フェニル-1,2-ジオキセタンなどを、酵素として β -D-ガラクトシダーゼを用いる場合には基質としてフルオレセインジ(β-D-ガラクトピラノシド)、または4-メチルウンベリフェリル-β-D-ガラクトピラノシド等と組み合わせて用いられる。

【0024】本発明の方法において測定の対象となるC

II-Tを含有する哺乳動物の体液とは、ヒト、ウマ、ウサギ、ラット、マウス、ウシ等の体液をいい、血清あるいは血漿形態の血液、関節液、リンパ液、胸腺水、腹水、羊水、細胞組織液、骨髄液、尿等の体液のいずれであってもよい。かくして、本発明により、体液中のCII-Tを簡便かつ精密に測定することができる。

【0025】

【実施例】以下、実施例により本発明を記述するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0026】[実施例1]

(1) ヒトCII-Tの合成

27アミノ酸配列(一文字表記による配列は以下である。:(N末端)GPGIDMSAFAGLGPREKGDPLQYMRA(C末端)を有するヒトCII-Tをペプチド合成機(Applied Biosystems社製)で合成した。さらに、合成が終了したペプチド樹脂を、以下の順でTMSBrクリベッジ法で合成時の保護基の脱保護を行いCII-Tを得た。すなわち、ペプチド樹脂400mgをチオアニソール1.2ml、エタジオール0.6ml、m-クレゾール0.2ml、TFA7.5ml、TMSBr1.35mlに溶解し、氷冷下2時間攪拌した。次に、予め冷やしておいたジエチルエーテルを加え、析出した沈殿を濾過し、残渣に2規定酢酸を加えてペプチドを抽出し、pHを6.0に調整後、ゲル濾過を行いCII-Tを得た。

【0027】(2) CII-T-キャリア蛋白複合体の調製

CII-T0.5mgを0.1M磷酸緩衝液(以下PBと略す)(pH6.5)50μlに溶解した。これとは別にKLH0.5mgを0.1MPB(pH6.5)50μlに溶解した。この二つの溶液を混和し、ゆっくりと攪拌した。そこへ、グルタルアルデヒドの0.1MPB(pH6.0)溶液を2倍当量加え、37℃で2時間攪拌した。その後、ゲル濾過による精製を行い、目的物を得た。

【0028】(3) 抗原刺激リンパ球の調製

雄Balb/cマウスの腹腔内に、CII-T-KLH複合体90μgとFreund's Complete Adjuvantとのエマルジョンを投与した。その後1~2週間間隔で5回CII-T-KLH複合体40μgとFreund's Complete Adjuvantとのエマルジョンを腹腔内投与した。5回目投与後10日目に、CII-T-KLH複合体50μgを生理食塩水0.25mlに溶解して静脈内に投与した。その4日後に無菌的にマウスから脾臓を摘出し、ステンレス製メッシュを通過させることにより、RPMI-1640培地(GIBCO製)中に浮遊させた脾細胞懸濁液を調製した。

【0029】(4) 細胞融合

マウス骨髄腫細胞P3U1は、GIT培地(日本製薬(株)製)の中で培養した。(3)で調製した該脾細胞

とP3U1とを、細胞数3対1の比率で無血清RPMI-1640培地中に懸濁し、1500rpm×5分間の条件で遠心分離した。上記培地を除去した後、沈降細胞に平均分子量1500の50%ポリエチレングリコール/無血清RPMI-1640培地溶液(pH7.2)1mlを静かに加えつつ懸濁液とした。その後、1500rpm×5分間で遠心分離して上清培地を除去した後、沈降した細胞にHAT培地40mlを加え懸濁した。

【0030】(5) クローン化ハイブリドーマの取得
融合細胞液を96穴マイクロプレート上に分配した(1穴につき200μl)。このプレートを37℃、5%CO₂雰囲気中で培養した。1日後、2日後、およびその後2日毎に半分量の培地を新たなHAT培地と交換して培養した。11日後にハイブリドーマの培養上清中のCII-Tに対する抗体について、酵素免疫測定法によりスクリーニングを行った。スクリーニングに用いられた抗原はCII-T、第2抗体は西洋ワサビペルオキシダーゼ(以下HRPと略す)標識したヤギ抗マウスIgG抗体であった。ハイブリドーマを分配した192穴のうち102穴中に融合細胞のコロニーを認め、その内2穴が陽性であった。

【0031】かくして得られた抗体陽性の各穴中のハイブリドーマを、96穴マイクロプレートの1穴あたり0.9細胞になるように希釈し、Balb/cマウスの腹腔マクロファージ細胞をフィーダー細胞として予め培養しておいた96穴マイクロプレートで培養した。顕微鏡下で観察し、確実にシングルコロニーであることを認めた穴のハイブリドーマの培養上清中のCII-Tに対*

*する抗体について、酵素免疫測定法によりスクリーニングを行った。両穴ともに抗体陽性であり、抗CII-Tモノクローナル抗体を産生していた。

【0032】(6) ハイブリドーマの培養

これらのクローン化ハイブリドーマを、1週間前にプリスタン(Aldrich社製)0.1mlを腹腔内投与したBalb/cマウスに、細胞数10⁶~10⁷個/匹の割合で腹腔内投与した。その後7~10日目に、腹水を1匹あたり2~3ml採取した。

【0033】(7) モノクローナル抗体の精製

採取した腹水を、エイらの方法(P.L. Ey et al., Immunochimistry, 15, 429-436 (1978))により精製した。すなわち0.1M PB(pH8.0)で平衡化したプロテインA-セファロースカラム(ゲル容量5ml)に、腹水2mlを流し、その後0.1Mクエン酸ナトリウム(pH6.0、5.0、4.0および3.0である緩衝液を順次流してカラムからモノクローナル抗体を溶出し、精製モノクローナル抗体、すなわちCII-T-3B8-A9-A9、CII-T-2A9-H9-E1およびCII-T-2F9-D1-D2を得た。

【0034】(8) 精製したモノクローナル抗体のクラス

精製したモノクローナル抗体のクラスを、マウスモノクローナル抗体タイピングキット(THY BINDING SITE社製)を用いて決定した。その結果を表1に示す。

【0035】

【表1】

抗体名	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgM
CII-T-3B8-A9-A9	-	+	-	-	-
CII-T-2A9-H9-E1	-	+	-	-	-
CII-T-2F9-D1-D2	-	+	-	-	-

【0036】【実施例2】

ポリクローナル抗体の作製

ウサギの皮下に、実施例1で精製したCII-T-KLH複合体1mgとFreund's Complete Adjuvantとのエマルジョンを皮内投与した。さらに、10日間隔でCII-T-KLH複合体0.5mgとFreund's Complete Adjuvantとのエマルジョンを4回皮内投与した。最終投与後10日目に採血し、血清とした後、酵素免疫測定法で抗体価を測定した。すなわちCII-Tを抗原とし、第2抗体にHRP標識したヤギ抗ウサギIgG抗体で、CII-Tに対する抗体価を測定し、40万倍であることを確認した。その後、全血を採取して血清とし、プロテインA-セファロースカラムで精製してCII-Tに対する抗体を得た。

【0037】【実施例3】

(1) 抗体固定化ビーズの調製

※ポリスチレン製ビーズ(直径6mm)をよく洗浄してから、実施例2で得た20μg/mlの抗CII-Tポリクローナル抗体のPBS溶液中に、4℃の温度で一昼夜放置した。これをPBSで洗浄し、1%ウシ血清アルブミン(以下BSAと略す)のPBS溶液中に、4℃の温度で一昼夜放置してアフターコーティング処理し、抗CII-T抗体固定化ビーズを得た。

【0038】(2) HRP標識抗体の調製

実施例1で採取した抗CII-Tモノクローナル抗体CII-T-3B8-A9-A9の1mg/ml 0.01M磷酸-0.15M NaCl溶液(pH7.4)に、10mg/mlのMBSのジメチルホルムアミド(以下DMFと略す)溶液50μlを添加し、25℃の温度で30分間反応させた。次いでセファデックスG-25を充填したカラム、0.1M PB(pH6.0)を用いてゲル濾過を行い、マレイミド化抗体と未反応M

BSを分離した。

【0039】一方、HRPの10mg/ml 0.1M PB (pH6.5) 溶液2mlに、S-アセチルメルカプト無水コハク酸の60mg/ml DMF溶液120μlを加え、25℃で2時間反応させた。次に0.1Mトリス-塩酸緩衝液 (pH7.0) を800μl、0.1M EDTA160μl、1Mヒドロキシルアミン1.6mlを加え、37℃で4分間反応させた。次に、反応液をニトロセルロース透析膜に入れ、5mM EDTA-0.1M PB (pH6.0) 溶液に対し、10

4℃で3日間透析し、チオール化HRPを得た。
【0040】次に、マレイミド化抗体2mgとチオール化HRP4mgとを混合し、フィルトロン攪拌セル (富士フィルター工業 (株)) を用いて氷冷下、蛋白濃度が4~10mg/mlになるまで濃縮した後、4℃の温度で一昼夜放置した。その溶液を、ウルトロゲルAcA44 (LKB社) を充填したカラムでゲル透過し、HRP標識抗CII-T抗体を得た。

【0041】(3) サンドイッチEIA測定系

(1) で調製した抗CII-T固定化ビーズ1個と精製したCII-T (標準物質) を0~16ng/mlの範囲で含有する1%BSA-0.05M TBS (トリスバッファードセリン) (pH8.0) 200μlと、(2) で作製したHRP標識CII-T抗体の1%*

*BSA-0.05M TBS (pH8.0) 溶液200μlとを各試験管に加え、37℃で90分間インキュベートした。次に試験管内の溶液を吸引除去した後、0.05%Tween20-生理食塩水で洗浄を行った。その後0.02%3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン塩酸塩、および2.5mMの濃度で過酸化水素を含有する0.1M磷酸/クエン酸緩衝液 (pH4.3) を0.4mlずつ各試験管に加え、37℃の温度で30分間反応させた後、1規定硫酸水溶液を1mlずつ加えて酵素反応を停止させた。

【0042】次いで、分光光度計を用いてこの溶液の450nmの波長における吸引強度を測定した。この吸引強度を標準物質濃度0~16ng/mlに対してプロットし、検量線を得た。この検量線を図1に示す。図1より、本発明の測定方法を用いれば、0.05ng/mlまで精度よく測定可能であることがわかる。

【0043】[実施例4]

ヒト関節液中のCII-Tの測定

実施例3の手法および実施例3で得た検量線を用いて、慢性関節リウマチ患者2名と変形性関節症患者2名の関節液を測定した。結果を表2に示す。

【0044】

【表2】

検体番号	疾患名	検体濃度 (ng/ml)
1	慢性関節リウマチ	1.00
2	同上	1.10
3	変形性関節症	2.00
4	同上	2.20

【0045】[実施例5]

ヒト正常小児血漿中のCII-Tの測定

実施例3の手法および実施例3で得た検量線を用いて、4名分のヒト正常小児血漿を測定した。結果を表3に示す※

※す。

【0046】

【表3】

検体番号	検体名	検体濃度 (ng/ml)
1	ヒト正常小児血漿	0.13
2	同上	1.73
3	同上	0.59
4	同上	0.19

【0047】

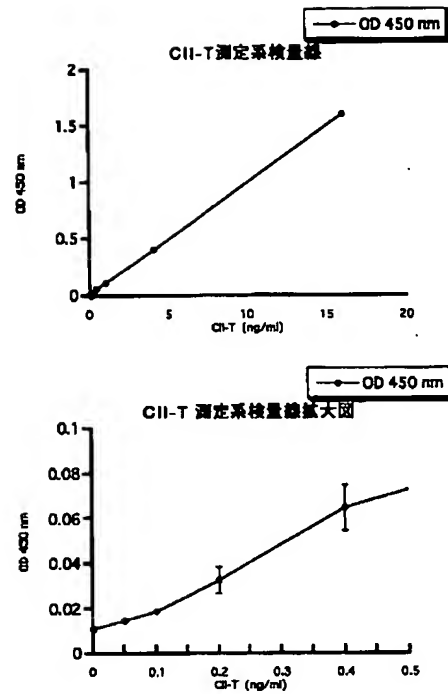
【発明の効果】本発明は、軟骨破壊が進行する慢性関節リウマチ、変形性関節症患者検体において、初めて直接2型コラーゲンテロペプチドの測定を可能にした。また、正常小児血漿中に2型コラーゲンテロペプチドが存★

★在することを明らかにした。本発明は、軟骨の代謝異常が原因となる疾患の診断、治療、経時の追跡に効果を発揮すると考えられる。

【図面の簡単な説明】

【図1】2型コラーゲンテロペプチドの検量線

【図1】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/535			G 0 1 N 33/577	B
33/577		9162-4B	C 1 2 N 15/00	C
//(C 1 2 P 21/08				
C 1 2 R 1:91)				

(72) 発明者 細田 健治
 東京都日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人
 株式会社東京研究センター内

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
 - ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
 - ☐ FADED TEXT OR DRAWING
 - ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
 - ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
 - ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
 - ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
 - ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
 - ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
 - ☐ OTHER:
-

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.